



TITLE:

Development of a Screening Process from
Virtual Mirror-image Library of Natural
Products Using D-Protein Technology(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Noguchi, Taro

CITATION:

Noguchi, Taro. Development of a Screening Process from Virtual Mirror-image Library of Natural Products Using D-Protein Technology. 京都大学, 2017, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20312>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-03-22に公開; 許諾条件により要旨は2017-06-22に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（薬科学）	氏名	野口 太朗
論文題目	Development of a Screening Process from Virtual Mirror-image Library of Natural Products Using D-Protein Technology （鏡像体タンパク質を用いた天然物の鏡像体群からの医薬品探索法の開発）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>キラルな天然物の鏡像体は、天然物と同等の化合物特性を有することから医薬品探索の新たなリソースとして期待される。一方、その鏡像体群は、自然界からの供給が困難であることから、新たな探索手法の開発が求められる。著者は、生体内タンパク質（L-タンパク質）の鏡像体であるD-タンパク質を化学合成し、これを用いて天然物のスクリーニングを行うことで、天然物の鏡像体群のL-タンパク質に対する生物活性評価と同等のことを実現できると考えた（Figure 1）。著者は、抗癌剤の標的分子として期待されるタンパク質ドメイン構造に対する阻害剤の探索系の構築を通して、本概念に基づく探索プロセスの有用性について検討した。</p> <div><div><p>D-protein</p><p>Natural product library</p></div><div><p>L-protein</p><p>Mirror-image library of natural products</p></div></div> <p>Figure 1. Concept of Mirror-image Screening.</p>			
<p>第一章：化学合成タンパク質を用いた鏡像スクリーニングの方法論の確立</p> <p>第一章第一節：化合物アレイ解析によるMDM2-p53およびMDMX-p53相互作用阻害剤の探索：新規ペプチド性阻害剤の同定</p> <p>癌抑制タンパク質p53の負の調節因子であるMDM2及びMDMXを標的分子として、これらに対するタンパク質間相互作用阻害剤を探索した。化学合成タンパク質を用いたスループット性の高いスクリーニングの実現を目的として、化合物アレイ解析による一次評価と、蛍光偏光法による二次評価を計画した。</p> <p>まず、MDM2及びMDMXの煩雑な合成プロセスの改善を目的として、固相樹脂と縮合条件を精査した結果、固相樹脂上で一挙にペプチド鎖全長を合成できることを明らかにした。これにより得られた蛍光標識MDM2及びMDMXのL-タンパク質を化合物アレイ解析に応用し、7,600種類からなる化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、L-MDM2とL-MDMXの両方に結合活性を示す38化合物を同定した。このうち3化合物が、p53との相互作用を阻害することを蛍光偏光法による競合阻害実験より確認した。</p>			
<p>第一章第二節：天然物の鏡像体群をリソースとする医薬品探索法の開発</p> <p>天然物の鏡像体群からの抗癌剤候補化合物の探索を目的として、D-MDM2を用い</p>			

たスクリーニングを実施した。天然有機化合物群（22,293化合物）を化合物アレイ解析によりスクリーニングした後、蛍光偏光法によるp53阻害活性を評価し、D-MDM2-D-p53相互作用に対して選択的な阻害活性を示すNP843を見出した。続いて、ヒット化合物の鏡像体（*ent*-NP843）をキラルプール法により合成した。NP843, *ent*-NP843の生物活性を評価したところ、期待通り*ent*-NP843はL-MDM2に対して選択的に阻害活性を示し、その活性値はD-MDM2に対するNP843の活性値と同等であった（Figure 2）。

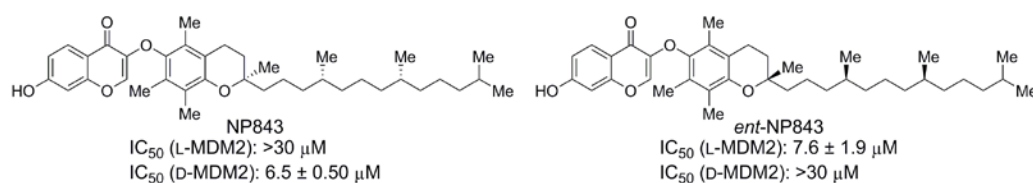


Figure 2. Structures and Bioactivities of NP843 and *ent*-NP843.

以上により、天然物の鏡像体群を医薬品探索のリソースとする探索手法の概念を実証するとともに、MDM2を標的とする新規阻害剤を見出した。

第二章：Grb2 SH2ドメインの化学合成と鏡像スクリーニングへの応用

鏡像スクリーニングの更なる有用性の獲得を目的として、細胞増殖シグナルに関与するGrb2 SH2ドメインの化学合成と生物活性評価系への応用について検討した。

Grb2 SH2ドメイン（Grb2⁵³⁻¹⁵⁴）の両エナンチオマーは、Grb2⁵³⁻⁸¹とGrb2⁸²⁻¹⁵⁴の2セグメント、もしくは、Grb2⁵³⁻⁸¹、Grb2⁸²⁻¹¹⁴、Grb2¹¹⁵⁻¹⁵⁴の3セグメントを用いたnative chemical ligationにより合成した。同様の合成法により、生物活性評価系に利用可能な適切なタグを配置した修飾体を調製した。得られたL-及びD-Grb2 SH2ドメインは、その標的であるEGFRペプチドを立体特異的に認識した。また、ELISAによる競合阻害実験においてもL-Grb2-L-EGFR及びD-Grb2-D-EGFR間のタンパク質間相互作用を立体特異的に評価可能であった。

以上により、これまでに報告例のないSH2ドメインの化学合成を実現するとともに、D-Grb2 SH2ドメインを用いた二種類の評価系を構築したことにより、鏡像スクリーニングへの応用可能性を明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

本学位論文において申請者は、光学活性な天然有機化合物の鏡像体を創薬シーズとして有効活用することを目的として、鏡像体タンパク質 (D-タンパク質) を用いる新しい医薬品探索法の提案と実証を行った。第一章第一節に述べられているように、申請者は癌抑制タンパク質 p53 の負の調整因子として知られる L-MDM2 と L-MDMX を標的として選択した。これらタンパクの化学合成を行い、化合物アレイ解析により p53 との相互作用を阻害する化合物を同定することに成功した。ここで得られた知見を活用し、第一章第二節においては対応する D-タンパク質の合成とスクリーニング系の構築を行った。化合物アレイ法により、天然有機化合物群 (22,293 化合物) のスクリーニングを実施した後、蛍光偏光法による p53 阻害活性の評価を行った結果、D-タンパク質選択的に作用するトコフェロール誘導体 NP843 を見出した。引き続き、ヒット化合物 NP843 とその鏡像異性体 (*ent*-NP843) を化学合成し、これらの生物活性評価を行った。その結果、期待通り *ent*-NP843 が L-MDM2 に対して選択的な阻害活性を示すことを示し、D-タンパク質を用いた化合物評価法が生体内で作用する創薬リードを見出す上で有用であることを実証した。第二章においては、細胞増殖シグナルに關与する Grb2 SH2 ドメインの化学合成法について検討を行い、Native chemical ligation 法を活用した Grb2 SH2 ドメインの合成法を開発することに成功した。さらに、ELISA 法による競合阻害実験によって、適切なタグを配置した L-および D-タンパク質の修飾体が EGFR とのタンパク質間相互作用を評価する上で有用であることを示した。

これらの研究成果は、これまで合成法が知られていなかったタンパク質の化学合成に成功した点において高い学術的な価値を有するだけでなく、キラルな化合物ライブラリーの価値を実質的に 2 倍にするための新たなアプローチとして、創薬研究において極めて有用である。よって、本論文は博士 (薬科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 29 年 2 月 17 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 2017 年 6 月 22 日以降